

BEST AVAILABLE COPY

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-344401

(43)Date of publication of application : 03.12.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/53  
G01N 37/00  
// C12M 1/00

(21)Application number : 2002-157142

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 30.05.2002

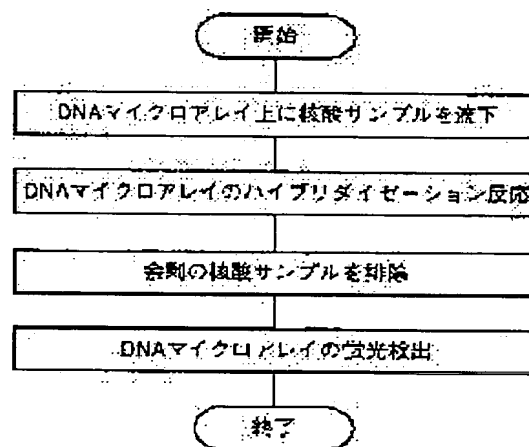
(72)Inventor : IMABAYASHI HIROYUKI  
MISHIMA SHUZO  
ISHII HIDEKAZU  
SHIBAZAKI TAKAMI

## (54) INSPECTION METHOD OF ORGANISM-RELATED MATERIAL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an inspection method capable of inspecting an organism-related material, simply, simultaneously, accurately in a short time.

SOLUTION: Genetic screening which is an example of organism-related material inspection is performed by following procedures: first of all, a nucleic acid sample 114 which is a specimen liquid is dropped onto a DNA micro-array 101; then, a hybridization reaction of the DNA micro-array 101 is generated; thereafter, an excessive nucleic acid sample 114 is removed from the DNA micro-array 101; finally, fluorescence observation of the DNA micro-array 101 is performed by a microscope 102.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 28.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2003-344401  
(P2003-344401A)

(43)公開日 平成15年12月3日(2003.12.3)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターミナル*(参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 9
37/00	1 0 2	37/00	1 0 2
// C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願2002-157142(P2002-157142)

(22)出願日 平成14年5月30日(2002.5.30)

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 今林 浩之

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(72)発明者 三島 周三

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(74)代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

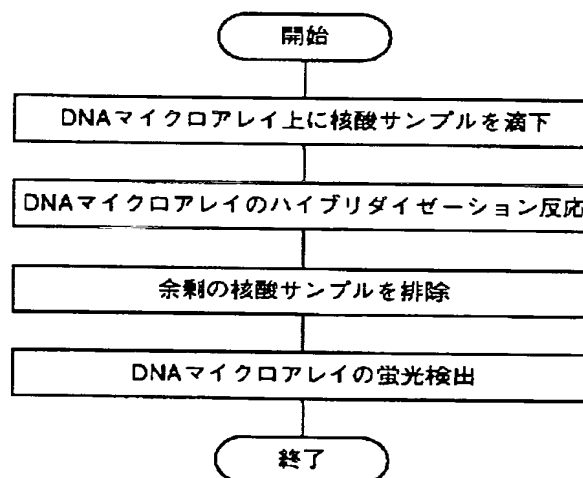
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体関連物質の検査方法

(57)【要約】

【課題】生体関連物質を短時間で簡便にリアルタイムで正確に検査できる検査方法を提供する。

【解決手段】生体関連物質検査の一例である遺伝子検査は以下の手順で行なわれる。まず、DNAマイクロアレイ101の上に検体液である核酸サンプル114を滴下する。次に、DNAマイクロアレイ101のハイブリダイゼーション反応を起こさせる。その後、余剰の核酸サンプル114をDNAマイクロアレイ101より排除する。最後に、顕微鏡102により、DNAマイクロアレイ101を蛍光観察する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 流体を通し得る固相担体を利用した生体関連物質の反応をリアルタイムで検査するための生体関連物質の検査方法であり、

固相担体に生体関連物質を供給する供給工程と、固相担体上において生体関連物質の反応を起こさせる反応工程と、

生体関連物質の反応後に余剰の生体関連物質を排除する排除工程と、

固相担体と反応した生体関連物質を光学的に観察する観察工程とを有している、生体関連物質の検査方法。

【請求項 2】 反応工程と排除工程と観察工程とが加温雰囲気下で行なわれる、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】 排除工程は、固相担体を洗浄水中に浸す工程を含んでいる、請求項 1 または請求項 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】 排除工程は更に、洗浄水に超音波振動を加える工程を含んでいる、請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 5】 排除工程は更に、固相担体の上側から洗浄水を除去する工程を含んでいる、請求項 3 に記載の検査方法。

【請求項 6】 排除工程は、固相担体に気体を通過させる工程を含んでいる、請求項 1 または請求項 2 に記載の検査方法。

【請求項 7】 固相担体に通過させられる気体が温度制御された微小液滴を含んでいる、請求項 6 に記載の検査方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体関連物質の検査方法、すなわち生体関連物質の反応による情報を検出する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、遺伝子解析技術が進み、ヒトを含む多くの生物における遺伝子配列が明らかにされつつある。また、解析された遺伝子産物と疾病の因果関係も少しずつ解明されつつある。

【0003】現在用いられている遺伝子検査方法は、生体試料から核酸を抽出する工程、PCR、NASBA法などと呼ばれる核酸増幅方法を用いて検査対象となるターゲット遺伝子を増幅する工程、核酸を放射性同位元素や蛍光分子等によって標識する工程、標識されたターゲット遺伝子の塩基配列またはその濃度を測定する工程から構成されている。

【0004】最近では、蛍光標識された核酸を複数のキャピラリーを用いることで高速に多数のサンプルを処理できるキャピラリー電気泳動装置が数多く用いられている。これにより、従来の電気泳動装置などを用いた方法に比べて三分の 1 から四分の 1 程度の時間でできるようになった。

【0005】更に近年になって同時に複数の遺伝子を検査するための DNA チップを用いた検査方法が開発された。DNA チップは、ガラス基板の表面に多数の cDNA プローブを固定化するものや、半導体製造過程を応用してシリコン上の微小な領域に合成した多数のオリゴプロブを作製したものである。いずれもサンプル中の DNA の塩基配列や発現量を、複数、同時に決定出来る。

【0006】DNA チップの応用によって、多くの遺伝子発現量や複数の突然変異の解析を行うことが可能となった。また、DNA チップを用いて得られたデータから、多くの遺伝子を複数のグループに分類したり（即ち、クラスタリング）、発生や分化に伴う遺伝子の変動に関する情報が得られている。こうして得られた遺伝子情報は、インターネットを通じて容易にアクセス出来るようなデータベースとして利用されている。

【0007】遺伝子の発現量の検査や突然変異の解析が電気泳動法やマイクロアレイ法を用いて行われている。しかしながら、電気泳動法は、検査に必要な時間が長く、また、一度に行える検査は少数に限られるという欠点を有している。

【0008】DNA チップを用いた遺伝子解析方法は、一度に多数の検査を行える反面、長い検査時間を必要とし、多くの検査工程を含んでおり、煩雑な操作を必要としている。そのため、再現性のよい分析結果を得られないという欠点を有している。

【0009】このような欠点を克服するために、DNA チップの担体に、微細加工プロセスを利用して作製された多孔性ガラスウエハを用いる手法が開発された。このような多孔性ガラスウエハを DNA チップの担体に用いる手法は、例えば特表平 9-504864 号公報に開示されており、DNA チップと同様の検査を再現性が良く短時間でできる。

## 【0010】

【発明が解決しようとする課題】例えば、生体関連物質である遺伝子を検査する従来の多孔性ガラスウエハを DNA チップの担体に用いる手法では、液体の移動と温度制御を行う反応部分と、蛍光検出を行う測定部分とが別々であり、各種の装置構成が必要である。このため、各種の装置間の搬送に時間と手間を要するだけでなく、搬送時に温度変化が生じたり、搬送によりゴミが付着したりするなどの問題がある。測定結果の再現性を確保するために注意が必要と考えられる。

【0011】また、検査対象となる検体液中にもゴミなどが含まれている場合があり、正確な検査を行なう際の障害となっている。

【0012】なお、生体関連物質としてはタンパク質、細胞、組織等があり、前述の問題や障害は、これらを検査する方法が共通に抱えている課題である。

【0013】特に、臨床検査においては、遺伝子を短時間で高い精度で簡便に検査したいという要求が強く、こ

これらのユーザーニーズに応えることが難しいと推測される。

【0014】本発明は、このような現状を考慮して成されたものであり、その目的は、生体関連物質を短時間で簡便にリアルタイムで正確に検査できる検査方法を提供することである。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、流体を通し得る固相担体を利用した生体関連物質の反応をリアルタイムで検査するための生体関連物質の検査方法であり、固相担体に生体関連物質を供給する供給工程と、固相担体上において生体関連物質の反応を起こさせる反応工程と、生体関連物質の反応後に余剰の生体関連物質を排除する排除工程と、固相担体と反応した生体関連物質を光学的に観察する観察工程とを有している。反応工程と排除工程と観察工程は好ましくは加湿雰囲気下で行なわれる。

【0016】排除工程は、一例においては、固相担体を洗浄水中に浸す工程を含んでいる。排除工程は更に、洗浄水に超音波振動を加える工程を含んでもよい。排除工程は更に、固相担体の上側から洗浄水を除去する工程を含んでもよい。

【0017】排除工程は、別の一例においては、固相担体に気体を通過させる工程を含んでいる。固相担体に通過させられる気体は、温度制御された微小液滴を含んでもよい。

#### 【0018】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

#### 【0019】第一実施形態

本実施形態は、生体関連物質の検査方法の一例として、DNAマイクロアレイを利用した遺伝子検査に向けられている。しかし、本発明は、DNAマイクロアレイを利用した遺伝子検査に限定されるものではなく、遺伝子以外の他の生体関連物質の検査、例えば、プロテオームアレイを利用したタンパク質の検査にも同様に適用できる。

【0020】本実施形態において実施される遺伝子検査の基本的な原理は、配列が既知の固定化された核酸プローブを用いて、試料中に含まれる特定の配列をもった核酸鎖を検出するというものである。例えば、基板に一本鎖核酸の試料を固定化し、次に蛍光物質等で標識した試料中に含まれる核酸に接触させる。試料中の核酸が核酸プローブと相補的な配列を有していれば、試料中の核酸は、核酸プローブとハイブリダイズして二本鎖を形成し、基板上に固定される。従って、洗浄により未反応の核酸鎖を除去した後で、プローブに付された標識（ローダミン、FITC、Cy3、Cy5など）を蛍光検出することにより、プローブに対して相補的な配列を有する標的核酸が検出される。

【0021】本実施形態において、DNAマイクロアレイを利用した遺伝子検査に使用する遺伝子検査装置100の概略的な構成を図1に示す。

【0022】図1に示されるように、遺伝子検査装置100は、DNAマイクロアレイを含む反応容器101を支持すると共にDNAマイクロアレイの反応を促進するための反応ステージ103と、DNAマイクロアレイを光学的に観察するための顕微鏡102とを備えている。顕微鏡102はXYステージを有しており、反応ステージ103はXYステージの上に載置される。反応ステージ103は、例えば、顕微鏡102によって観察される視野を変更するために、XYステージによって移動される。

【0023】遺伝子検査装置100は更に、顕微鏡102によって得られるDNAマイクロアレイの蛍光画像を撮影するためのCCD (charge coupled device) カメラ104を備えている。CCDカメラ104は、検査精度向上のために、冷却型が好ましい。

【0024】遺伝子検査装置100は更に、反応ステージ103を覆うためのフード106を有している。フード106は、顕微鏡的観察に不要な外乱光を遮断するため、温度環境の変動を防止するため、観察領域内へのゴミの侵入を防止するために設けられている。フード106は、反応ステージ103を出し入れするための出入口と、顕微鏡的観察を可能にする観察窓とを有している。

【0025】反応ステージ103は、XYステージにより、反応容器101を設置する際にはフード106の外にせり出され、観察の際には、フード106の中に収容される。フード106の出入口は開閉扉を有しており、反応ステージ103の収容後、開閉扉が閉じられる。フード106の内部の環境は、その内部に設けられた温度調整器や湿度調整器によって一定に保たれてもよい。

【0026】図2に示されるように、反応容器101は、DNAマイクロアレイ110aを有する薄板形状のスライドチップ107と、これを上下から挟んで保持する上ハウジング108と下ハウジング109とを備えている。上ハウジング108と下ハウジング109は、好ましくは透光性のある部材で構成され、より好ましくは暗黒色の部材で構成される。上ハウジング108と下ハウジング109は、ネジや接着剤などの締結手段によって互いに固定されて、スライドチップ107を保持している。

【0027】スライドチップ107の上下面に、DNAマイクロアレイ110aを取り囲むように（図示しない）Oリングを設け、後に供給される流体（核酸サンプルや洗浄液）が上ハウジング108と下ハウジング109の隙間から漏れるのを防止してもよい。

【0028】図3に示されるように、スライドチップ107は、例えば、セラミック製の多孔質部110と、多孔質部110を間に挟んで支持するための一対の支持板

111とを備えている。一对の支持板111は、互に対応する位置に、DNAマイクロレイ110aを規定するための円形の開口部112を有している。つまり、DNAマイクロレイ110aは、多孔質部110の上下に配置された一对の支持板111にそれぞれ形成された一对の開口部112を介して露出している多孔質部110の部分という。

【0029】多孔質部110は、好ましくは、その厚み方向に延びている多数の微細な多孔を有している。ここで、多孔質部110は、必ずしもこのような構造である必要はなく、流体を通しさえすれば、どのような構造であってもよい。多孔質部110の材質は、遺伝子のハイブリダイズ反応の際にさらされる温度と圧力において多孔質部110が壊れさえしなければ、どのような材質であってもよい。

【0030】また、多孔質部110の厚みを十分に薄くし、多孔質の穴径も十分に小さくすれば、所要量のサンプルや試薬を多数の多孔に分配して収容させることができる。従って、多孔質部110の表面の特定面積当たり、所望量の液体を収容するのに必要な個数の多孔を作製し、その所定の面積に対してサンプルや試薬を供給すれば多孔質部110内で安定した分析を実行することができる。

【0031】図4に示されるように、上ハウジング108は、スライドチップ107のDNAマイクロレイ110aを露出させるためのテーパ形状の開口部113を有している。開口部113の内側の空間には、DNAマイクロレイ110aに供給される核酸サンプル114が貯められ得る。

【0032】下ハウジング109は、スライドチップ107のDNAマイクロレイ110aに対応する位置に形成された、その底面が傾斜している凹部115と、凹部115の最下部から下ハウジング109の下面まで延びている廃液のための廃液孔116と、廃液孔116の途中から下ハウジング109の側面まで延びている、DNAマイクロレイ110aに供給される核酸サンプル114を貯め得る貯液孔117とを有している。

【0033】DNAマイクロレイ110aには、例えば、インクジェット吐出原理を用いた液体分注装置により、核酸プローブ溶液の複数の液滴が吐出される。多孔質部110に吐出された核酸プローブ溶液の一つの液滴は、微細な多孔の内部に瞬時に吸引され、微小径の核酸プローブスポットが形成される。

【0034】図5に示されるように、DNAマイクロレイ110aは、このように形成された多数の核酸プローブスポット118を有している。通常、一つの核酸プローブスポット118は、そこに含まれる多孔質部110の部分の微細な多孔の内壁に一種類の核酸プローブ118が固定されている。言い換えれば、その内壁に一種類の核酸プローブ118が固定されている微細な多孔を

含む領域が一つの核酸プローブスポット118である。

【0035】通常、DNAマイクロレイ110a内の異なる核酸プローブスポット118には異なる種類の核酸プローブ118が固定されているが、必要に応じて、DNAマイクロレイ110a内の複数の核酸プローブスポット118に同じ核酸プローブ118が固定されていてもよい。また、多孔質部110の微細な多孔の内壁に表面処理を施し、流体への摩擦抵抗や核酸プローブ118等の試薬の吸着性が調節されてもよい。

【0036】スライドチップ107の大きさは、例えば、通常のスライドガラスの半分の大きさであり、約3.7mm×約1.2mm×約1mmである。例えば、DNAマイクロレイ110aは約4mmの直径を有し、一つの核酸プローブスポット118は約100μmの直径を有し、一つのDNAマイクロレイ110aの中に400個の核酸プローブスポット118が200μm間隔で配列されている。

【0037】一つの核酸プローブスポット118は、100ないし1000個、好ましくは1000個の微細な多孔を有し、一つの多孔は0.05μmの直径、好ましくは0.2μm程度の直径を有している。

【0038】DNAマイクロレイ110aは、一種類の反応が実施される一つの反応単位に対応している。従来のDNAチップは、スライドガラス表面にプローブを固定化して形成され、二次元的な広がりを持つ反応領域を有している。このようなDNAチップとは異なり、DNAマイクロレイ110aは、基板の表面における二次元的な広がりに加えて、基板のの厚み方向の広がりをも持つ三次元的な反応領域を有している。

【0039】核酸プローブ118は、一般的に、約10ヌクレオチド以上約100ヌクレオチド以下の核酸からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、一般的にハイブリダイゼーションにより核酸を検出する際に使用される。

【0040】DNAマイクロレイ110aに含まれる一つの核酸プローブスポット118は、前述したように複数の微細な多孔、つまり、微量な液体を収容し得る三次元的な空間を有している。一つの核酸プローブスポット118は、DNAマイクロレイ110aを上方から見たときの平面内で占める非常に狭いが、多孔質部110の厚さ方向に延びている三次元的な空間を有しているため、一つの核酸プローブスポット118が実際に占めている面積は見た目よりも遙かに大きい。

【0041】例えば、核酸プローブスポット118毎に（固定する核酸プローブ118の種類を変更したり、表面処理を変更したりする等して）条件を変えることによって、小さなDNAマイクロレイ110aの中で非常に多くの情報を充分な感度で得ることができる。

【0042】DNAマイクロレイ110aを用いた解析としては、例えば、被験者における癌遺伝子等の突然

変異の有無の検出、被験者における遺伝子の発現解析、薬剤耐性遺伝子の発現解析、被験者における疾病関連または感受性遺伝子の遺伝子型決定、被験者における細胞内シグナル遺伝子の発現パターンの決定等、臨床的な治療学および診断学的解析、並びに非臨床的な基礎研究においても種々の遺伝子解析等である。

【0043】ここに説明したスライドチップ107は一つのDNAマイクロアレイ110aを有しているが、スライドチップ107は複数のDNAマイクロアレイ110aを有していてもよい。このようなスライドチップ107においては、複数のDNAマイクロアレイ110aは、それぞれ異なる検体の検査に利用されもよく、あるいは、同じ検体の異なる種類の解析に利用されてもよい。

【0044】図6と図7に示されるように、反応ステージ103は、反応容器101が載置されるベース部120と、ベース部120に対して開閉し得るカバー部123とを有している。ベース部120とカバー部123は、反応容器101を支持する支持機構を構成している。反応容器101は、ベース部120の上に載置され、その後にはカバー部123が閉じられることにより、支持される。

【0045】カバー部123は、顕微鏡102によるDNAマイクロアレイ110aの観察を可能にする顕微鏡観察孔122と、顕微鏡観察孔122を塞いでいる光学的に透明な二枚のカバーガラス121とを有している。二枚のカバーガラス121は、間隔を置いて位置している。

【0046】ベース部120は、反応容器101の廃液孔116と流体的に連絡される排出用流路119と、排出用流路119と流体的に連絡した、ベース部120の側面で終端している廃液管134と、排出用流路119の途中に設けられた、排出用流路119を開閉するための電磁弁128とを有している。

【0047】排出用流路119は、反応容器101と対向する面で終端しており、その終端すなわち送液口の周りにはそれを取り囲む円形の溝が形成されており、その溝の中にはリング130が配置されている。排出用流路119は、反応ステージ103に支持された反応容器101の廃液孔116と、リング130によって液密に保たれて、流体的に連絡される。

【0048】反応ステージ103は更に、反応容器101に対して流体を移送するためのシリンジピストンポンプ部125を有している。シリンジピストンポンプ部125は、例えば、反応容器101内に供給された核酸サンプルを反応容器101内において移動させたり、あるいは、洗浄水を反応容器101内に供給したりする。

【0049】シリンジピストンポンプ部125は、反応容器101の貯液孔117と流体的に連絡される移送用流路124と、移送用流路124と流体的に連絡した、

反応容器101内の流体を移送するためのシリンジピストンポンプ131と、移送用流路124の途中に設けられた、移送用流路124を開閉するための電磁弁127とを有している。

【0050】移送用流路124は、反応容器101と対向する面で終端しており、その終端すなわち送液口の周りにはそれを取り囲む円形の溝が形成されており、その溝の中にはリング130が配置されている。移送用流路124は、反応ステージ103に支持された反応容器101の貯液孔117と、リング130によって液密に保たれて、流体的に連絡される。

【0051】シリンジピストンポンプ131は、シリンジ138と、シリンジ138内を移動し得るピストン129と、シリンジ138とピストン129を液密に保つためのシール139とを有している。

【0052】シリンジピストンポンプ部125のピストン129は、例えば（図示しない）モーターユニットによって駆動される。言い換えれば、遺伝子検査装置100は、図示されていないが、シリンジピストンポンプ部125のピストン129を駆動するためのモーターユニットを有している。モーターユニットは、例えば、ステッピングモータと、ステッピングモータの回転軸の運動を直線運動に変換するラックピニオン機構とで構成される。

【0053】シリンジピストンポンプ部125は更に、シリンジピストンポンプ131から延びている洗浄水流路と、洗浄水流路と流体的に連絡した、シリンジピストンポンプ部125の側面で終端している洗浄水配管132と、洗浄水流路の途中に設けられた、洗浄水流路を開閉するための電磁弁126とを有している。

【0054】図8に模式的に示されるように、シリンジピストンポンプ部125の洗浄水配管132は洗浄水タンク133と流体的に連絡され、ベース部120に設けられた廃液管134は、吸引ポンプ135を介して、廃液タンク136と流体的に連絡される。言い換えれば、遺伝子検査装置100は、反応ステージ103のシリンジピストンポンプ部125と流体的に連絡した洗浄水タンク133と、反応ステージ103の排出用流路119と流体的に連絡した廃液タンク136とを更に有している。

【0055】反応ステージ103は更に、反応容器101内のDNAマイクロアレイ110aの温度を調整するための温度調整機構を有している。温度調整機構は、反応容器101の温度を上げるための加熱手段を有している。加熱手段は、例えば、図6と図7に示されるように、シリコンラバーヒーターやセラミックヒーターやペルチェ素子等の板状ヒーター105である。

【0056】板状ヒーター105は、ベース部120とカバー部123に埋め込まれており、好ましくは、反応ステージ103に支持されている反応容器101と面接

触する。具体的には、図6と図7に示されるように、ベース部120に埋め込まれた板状ヒーター105は、これに載せられた反応容器101の下ハウジング109と面接触する。これにより、板状ヒーター105は反応容器101の温度を短時間で上昇させることができる。

【0057】温度調整機構は、好ましくは、反応容器101の温度を下げるための冷却手段を更に有している。冷却手段は、例えば、ベース部120とカバー部123に設けられた（図示しない）ペルチェ素子である。ペルチェ素子は、好ましくは、反応ステージ103に支持されている反応容器101と面接触する。

【0058】温度調整機構は、図示しない温度調整器によって駆動制御される。言い換えれば、遺伝子検査装置100は、図示されていないが、温度調整機構を駆動制御するための温度調整器を有している。

【0059】温度調整機構は更に反応容器101の温度をモニターするための温度センサーを有していてもよい。この場合、温度調整器は、温度センサーからの情報に基づいて、加熱手段や冷却手段を駆動制御してよい。

【0060】遺伝子検査装置100は更に、装置全体を制御する（図示しない）制御コンピューターを備えている。制御コンピューターは、反応ステージ103の位置を調整するためのXYステージ、シリンジピストンポンプ部125を駆動するためのモーターユニット、これらが設けられた流路を開閉するための複数の電磁弁、反応容器101から流体を排出させるための吸引ポンプ135、温度調整機構を駆動制御するための温度調整器などを制御する。

【0061】本実施形態における遺伝子検査は、図9に示されるフローに従って進められる。

【0062】すなわち、遺伝子検査においては、図9に示されるように、まず、DNAマイクロアレイ101の上に検体液である核酸サンプル114を滴下する。次に、DNAマイクロアレイ101のハイブリダイゼーション反応を起こさせる。その後、余剰の核酸サンプル114をDNAマイクロアレイ101より排除する。最後に、顕微鏡102により、DNAマイクロアレイ101を蛍光観察する。

【0063】より好ましくは、上述した工程は、核酸サンプル114の滴下を除いて、すべて加湿雰囲気で行なわれる。つまり、遺伝子検査は、より好ましくは、図10に示されるフローに従って進められる。

【0064】すなわち、より好適な遺伝子検査においては、図10に示されるように、まず、DNAマイクロアレイ101の上に検体液である核酸サンプル114を滴下する。次に、DNAマイクロアレイ101のハイブリダイゼーション反応を加湿雰囲気下で起こさせる。その後、余剰の核酸サンプル114をDNAマイクロアレイ101より加湿雰囲気下で排除する。最後に、顕微鏡102によりDNAマイクロアレイ101を加湿雰囲気下

で蛍光観察する。

【0065】以下、遺伝子検査装置100における具体的な動作について説明する。

【0066】図6において、カバー部123が開かれた状態で、反応容器101が反応ステージ103のベース部120に載置される。その後、反応容器101の開口部113の中に核酸サンプル114が供給される。その後、カバー部123が閉じられる。

【0067】これにより、反応容器101の廃液孔116がベース部120に設けられた排出用流路119と流体的に連絡されると共に、反応容器101の貯液孔117がシリンジピストンポンプ部125に設けられた送液用流路と流体的に連絡される。なお、シリンジピストンポンプ部125の内部の全ての流路は、反応容器101を載置する前に、予め洗浄水137で満たされている。

【0068】カバー部123が閉じられた状態では、カバー部123に設けられた下側のカバーガラス121は、反応容器101の上ハウジング108と面接触する。これにより、反応容器101の上ハウジング108に形成された開口部113が密閉される。

【0069】これにより、フード106内の埃などの異物が、反応容器101の上ハウジング108の開口部113内に入り込むことが防止される。これにより、異物の混入による顕微鏡102によるDNAマイクロアレイ110aの誤検査を防止できる。

【0070】その後、ハイブリダイズ反応を起こさせるため、反応容器101内のDNAマイクロアレイ110aが温度制御される。つまり、四つのヒーター105により、DNAマイクロアレイ110aと各液体が、ハイブリダイズ反応に適した温度に加温される。

【0071】反応容器101の開口部113はカバーガラス121によって密閉されているので、その内部は高湿度環境すなわち加湿雰囲気となる。これにより、核酸サンプル114は蒸発することがなく、核酸サンプル114の濃度は一定に保たれる。従って、不所望な核酸サンプル114の濃度変化は生じない。

【0072】また、反応容器101の開口部113は、密閉された空気を間に挟んで配置されている二枚のカバーガラス121を介して、外部環境と遮断されているので、外部環境との温度勾配が低減されている。これにより、温度制御中にカバーガラス121の面に結露が生じることが防止される。

【0073】続いて、DNAマイクロアレイ110a側の電磁弁127のみが開放され、図7に示されるように、シリンジピストンポンプ131のピストン129が紙面右側に移動される。これにより、核酸サンプル114は、DNAマイクロアレイ110aを通過し、下ハウジング109内の貯液孔117の中に移動する。

【0074】次に、図6に示されるように、ピストン129が紙面左側に移動される。これにより、核酸サン

ル114は、DNAマイクロアレイ110aを通過し、再びDNAマイクロアレイ110aの上側すなわち開口部113の中に戻る。

【0075】この動作は繰り返し行なわれる。これにより、核酸サンプル114は、短時間の内に、DNAマイクロアレイ110a内の核酸プローブスポット118とハイブリダイズ反応を起こす。その結果、所定の核酸プローブスポット118だけが後の蛍光観察の際に蛍光を発し得る。

【0076】貯液孔117の容積は予め、シリンジピストンポンプ部125の内部に核酸サンプル114が到達しないように決められている。また、シリンジピストンポンプ131は、貯液孔117の容積に応じてピストン129の移動距離が制限されて駆動される。これにより、核酸サンプル114がシリンジピストンポンプ部125の中に侵入することがなく、別のDNAマイクロアレイ110aをセットした際のキャリーオーバーが発生することはない。

【0077】ハイブリダイズ反応の終了後、余剰の核酸サンプル114を排除するために、DNAマイクロアレイ110aが洗浄水で洗浄される。DNAマイクロアレイ110aの洗浄は、以下の手順に従って行なわれる。

【0078】まず、図8において、DNAマイクロアレイ110a側の電磁弁127と吸引ポンプ135側の電磁弁128が閉じられ、洗浄水タンク133側の電磁弁126が開かれ、シリンジピストンポンプ131のピストン129が紙面右側に移動される。これにより、洗浄水タンク133の洗浄水137がシリンジ138内に吸引される。

【0079】次に、洗浄水タンク133側の電磁弁126が閉じられ、DNAマイクロアレイ110a側の電磁弁127が開かれ、ピストン129が紙面左側に移動される。これにより、洗浄水137が反応容器101の中に注入される。洗浄水137の注入は、洗浄水137がDNAマイクロアレイ110aを通過して、その上に貯まるまで続けられる。その結果、例えば図6に示されたテーパ形状開口部113に洗浄水が貯まり、DNAマイクロアレイ110aは洗浄水中に浸される。

【0080】その後、DNAマイクロアレイ110a側の電磁弁127が閉じられ、吸引ポンプ135側の電磁弁128が開かれ、吸引ポンプ135が動作される。これにより、反応容器101の中の洗浄水137と余剰の核酸サンプル114が廃液タンク136に排出される。

【0081】その一連の操作の結果、DNAマイクロアレイ110aが洗浄される。この洗浄は繰り返し行なわれてもよい。洗浄を繰り返し行なうことにより、余剰の核酸サンプル114がより確実に排除される。

【0082】洗浄の間、洗浄液137の流路途中に設けられた(図示しない)圧力センサーを利用して、洗浄液137の圧力が所定値を越えないように、シリンジピ

ストンポンプ131や吸引ポンプ135が制御されてもよい。

【0083】洗浄後、DNAマイクロアレイ110aは、顕微鏡102によって、蛍光観察される。

【0084】本実施形態においては、反応容器101内のDNAマイクロアレイ110aを各種装置間で搬送させることなく蛍光観察されるので、遺伝子のハイブリダイズ反応をリアルタイムで観察できる。

【0085】くわえて、蛍光観察の前にDNAマイクロアレイ110aを洗浄して余剰の核酸サンプルを排除しているので、DNAマイクロアレイ110aのバックグラウンドの自家蛍光が低減される。つまり、核酸プローブとハイブリダイズ反応を起こしたわけではなく、単にDNAマイクロアレイ110aに付着している核酸サンプルが原因でこれまで生じていた不所望な蛍光が完全に無くなる。これにより、核酸プローブスポットの蛍光強度のS/N比が向上され、微弱蛍光においても正確な検査を行なうことができる。

【0086】さらに、ハイブリダイズ反応が加温雰囲気下で行なわれるので、核酸サンプルの蒸発がなく、従って核酸サンプルの濃度変化がないので、核酸サンプルの濃度変化に起因した検査精度の低下が防止される。

【0087】本実施形態は、本発明の要旨を逸脱しない範囲において、様々な変更や修正が加えられてもよい。例えば、本実施形態では、DNAマイクロアレイ110aは洗浄水で洗浄されているが、水以外の他の液体で洗浄されてもよい。また、DNAマイクロアレイ110aは、気体たとえば空気で洗浄されてもよい。つまり、DNAマイクロアレイ110aは、これに気体を通過させることにより洗浄されてもよい。例えば、空気による洗浄は、電磁弁126を大気に開放された三方弁に変更することにより容易に実施され得る。

【0088】また、DNAマイクロアレイ110aは、温度制御された微小液滴を含む気体たとえば水蒸気で洗浄されてもよい。例えば、水蒸気による洗浄は、電磁弁126を三方弁に変更し、これに加温蒸気タンクに接続することにより容易に実施され得る。DNAマイクロアレイ110aは、これに水蒸気を通過させることにより洗浄される。水蒸気の温度は、ハイブリダイズ反応に適した温度よりも低いことが好ましい。

【0089】第二実施形態

本実施形態は、超音波を利用したDNAマイクロアレイの洗浄に向けられている。

【0090】図11に示されるように、ベース部120は、その上に載置された反応容器101の下ハウジング109と面接触する二枚の圧電素子140を備えている。圧電素子140は、例えば、10mm×30mm×1mmの大きさを有している。圧電素子140は、例えば、厚み方向の分極処理が施されたチタン酸シリコン酸鉛(PZT)の板と、その厚み方向の二面に蒸着された



銀電極とで構成されている。

【0091】圧電素子140には、図示しない駆動回路からフレキシブルケーブルなどを用いて、100V<sub>p-p</sub>程度の正弦波の交番電圧が印加される。圧電素子140に印加する交番電圧の周波数は、好ましくは、ステージ103の固有振動数に一致した周波数である。このような周波数の交番電圧の印加に対して、圧電素子140は強い超音波振動を発生する。

【0092】図11に示されるように、ハイブリダイズ反応の終了後、シリンジピストンポンプ131により、洗浄水137がDNAマイクロアレイ110aの上まで送液される。このようにDNAマイクロアレイ110aの上まで洗浄水137が供給されている状態で、ベース部120に内蔵されている圧電素子140が正弦波の交番電圧で駆動され、圧電素子140は超音波振動を発生する。これにより、洗浄水が供給されている部分は超音波洗浄される。

【0093】その後、廃液用電磁弁128を開放し、他の電磁弁126と127を閉じ、吸引ポンプ135を動作させることにより、余剰の核酸サンプル114と洗浄水137は反応容器101から排除される。

【0094】本実施形態では、洗浄水による洗浄の際に超音波振動を加えることにより、その洗浄効果が更に向上される。従って、蛍光観察の前に余剰の核酸サンプルがより確実に排除される。その結果、不所望な自家蛍光が更に軽減され、核酸プローブスポットの蛍光強度のS/N比が更に向上され、より正確な検査を行なうことができる。

### 【0095】第三実施形態

本実施形態は、DNAマイクロアレイの上方からの洗浄水の供給と吸引に向けられている。

【0096】図12と図13に示されるように、検査装置は、洗浄水をDNAマイクロアレイに上方からすなわち検査面側から供給する洗浄ノズル141を更に有している。洗浄ノズル141は、反応ステージ103のカバー部123が開かれた状態で、反応容器101の上ハウジング108と接触され、上ハウジング108に形成されたテーパ形状開口部113に洗浄液を供給する。図示しないが、洗浄ノズル141は別の搬送部材により支持されており、洗浄ノズル141には洗浄水タンク133の洗浄水137を送液するポンプが接続されている。

【0097】ハイブリダイズ反応の終了後、図12に示されるように、カバー部123が開けられ、洗浄ノズル141が反応容器101の上ハウジング108と接触され、上ハウジング108に形成されたテーパ形状開口部113に洗浄液が供給される。

【0098】洗浄ノズル141から洗浄液が供給されている間、廃液用電磁弁128だけが開かれ、吸引ポンプ135が動作されている。これにより、洗浄水137が余剰の核酸サンプル114と共に反応容器101から排

出される。

【0099】第二実施形態と同様に、ベース部120は洗浄効果を高める圧電素子140を備えており、この洗浄動作の間、圧電素子140による超音波洗浄が併用されてもよい。

【0100】その後、図13に示されるように、シリンジピストンポンプ131より、洗浄水タンク133の洗浄水137をDNAマイクロアレイ110aに送りながら、洗浄ノズル141により洗浄水が吸引され除去される。これにより余剰の核酸サンプルが除去される。

【0101】本実施形態では、洗浄動作の間、洗浄水が一方向に流されるので、DNAマイクロアレイ110aは常に正常な洗浄水で洗浄され続ける。これにより、洗浄時間が大幅に短縮される。また、DNAマイクロアレイ110aの上方に位置する洗浄ノズルによって洗浄液が吸引されて除去されることにより、DNAマイクロアレイ110aの上側すなわち検査面側に存在するゴミも一緒に除去される。

【0102】その結果、核酸サンプル114はハイブリダイズ反応を起こした適正な核酸プローブスポットにのみ存在し、余剰の核酸サンプル114は殆ど存在しなくなる。これにより、不所望な自家蛍光が更に軽減され、蛍光観察のS/N比が更に向上される。従って、より正確な検査を行なうことができる。

【0103】DNAマイクロアレイを洗浄するための物質は液体に限定されるものではない。つまり、洗浄ノズル141から供給される物質は、温度制御された微小液滴であってもよい。温度制御された微小液滴も、余剰の核酸サンプル114を効率よく除去し得る。好ましくは、DNAマイクロアレイを通過する際の圧力負荷を抑えるために、蒸気の液滴の大きさは、数 $\mu$ m程度以下の大きさであるといふ。また、洗浄ノズル141から供給される物質は、蒸気や空気であってもよい。

【0104】これまで、図面を参照しながら本発明の実施の形態を述べたが、本発明は、これらの実施の形態に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において様々な変形や変更が施されてもよい。

### 【0105】

【発明の効果】本発明によれば、光学的な観察の前に余剰の生体関連物質が排除されるので、生体関連物質を短時間で簡便にリアルタイムで正確に検査できる検査方法が提供される。本発明の検査方法によれば、反応部分の検体液の状態（濃度など）や、温度条件を変化させながら対象生体関連物質の反応程度をリアルタイムで測定することができる。従って、対象生体関連物質の発現の有無やその発現量を正確に測定することができる。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第一実施形態における遺伝子検査装置の概略的な斜視図であり、フード内に収容された反応ステージを示すために、フードを透かして描かれている。

【図 2】図 1 に示された反応容器の分解斜視図である。

【図 3】図 3 に示されたスライドチップの分解斜視図である。

【図 4】図 3 に示された反応容器の側方縦断面図を示している。

【図 5】DNA マイクロアレイに記列された多数の核酸プローブスポットを示している。

【図 6】図 1 に示された反応ステージと反応容器の側方縦断面図であり、反応容器が設置された直後の、核酸サンプルが DNA マイクロアレイの上に位置している状態を示している。

【図 7】図 1 に示された反応ステージと反応容器の側方断面図であり、核酸サンプルが貯液孔に移動された状態を示している。

【図 8】本発明の第一実施形態における遺伝子検査装置の流路を概略的に示している。

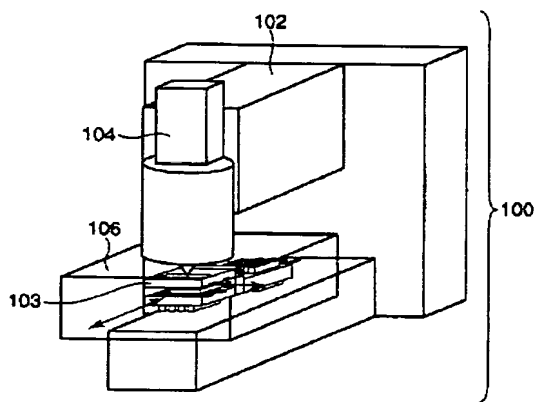
【図 9】本実施形態における遺伝子検査のフローを示している。

【図 10】本実施形態におけるより好適な遺伝子検査のフローを示している。

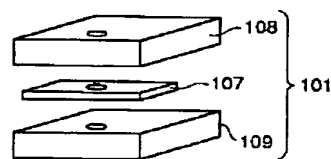
【図 11】本発明の第二実施形態における反応ステージと反応容器の断面図であり、ベース部に設けられた圧電素子により DNA マイクロアレイが超音波洗浄されている状態を示している。

【図 12】本発明の第三実施形態における遺伝子検査装置における反応ステージと反応容器と洗浄ノズルの断面図であり、洗浄ノズルから洗浄水が供給されている状態を示している。

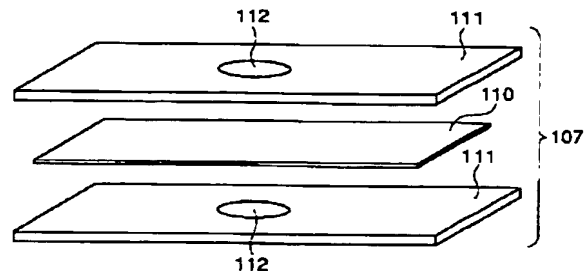
【図 1】



【図 2】



【図 3】

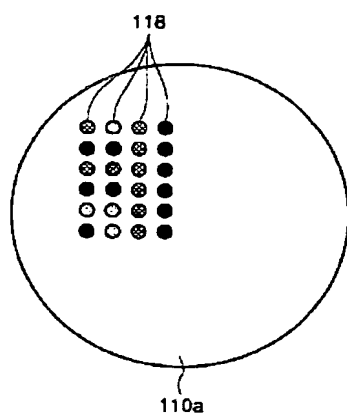


【図 13】本発明の第三実施形態における遺伝子検査装置における反応ステージと反応容器と洗浄ノズルの断面図であり、洗浄ノズルにより洗浄水が吸引されている状態を示している。

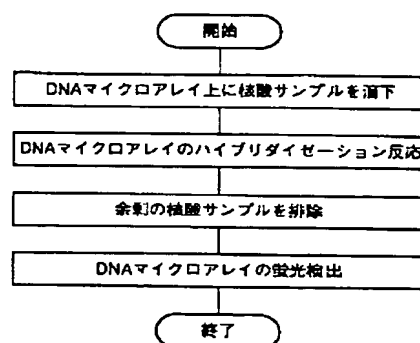
## 【符号の説明】

- 100 遺伝子検査装置
- 101 反応容器
- 102 顕微鏡
- 103 反応ステージ
- 104 CCDカメラ
- 105 板状ヒーター
- 107 スライドチップ
- 108 上ハウジング
- 109 下ハウジング
- 110 多孔質部
- 110a DNA マイクロアレイ
- 111 支持板
- 116 廃液孔
- 117 貯液孔
- 119 排出用流路
- 120 ベース部
- 123 カバー部
- 124 移送用流路
- 125 シリンジピストンポンプ部
- 131 シリンジピストンポンプ
- 133 洗浄水タンク
- 135 吸引ポンプ
- 136 廃液タンク

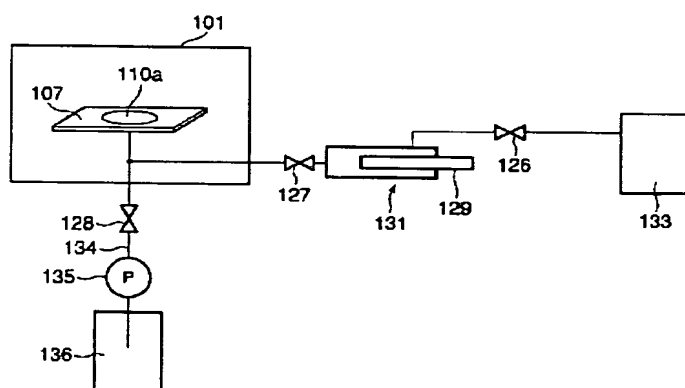
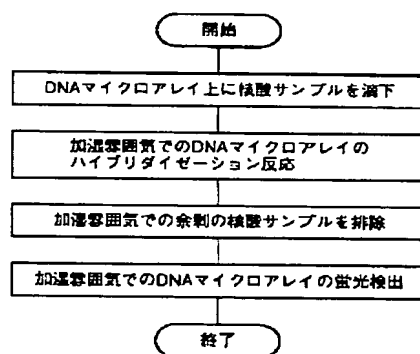
【図 5】



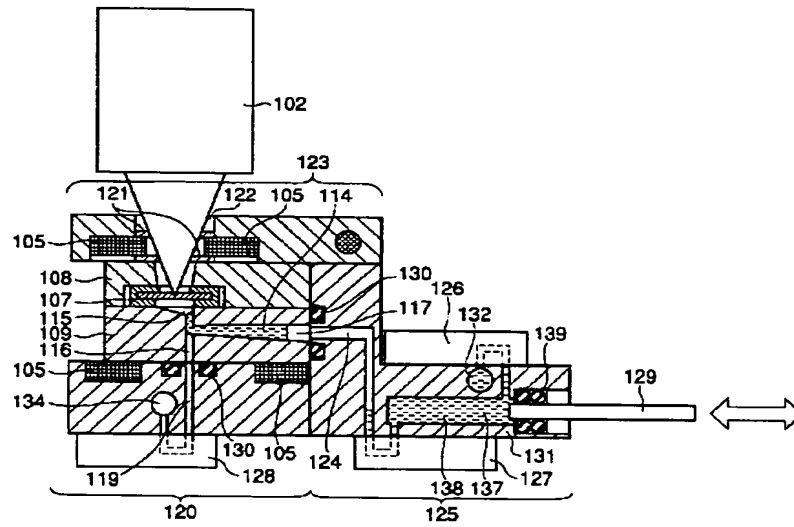
【图 9】



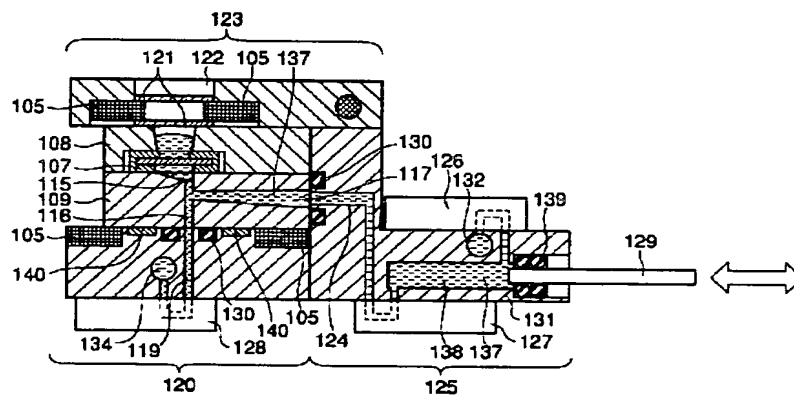
【図 8】



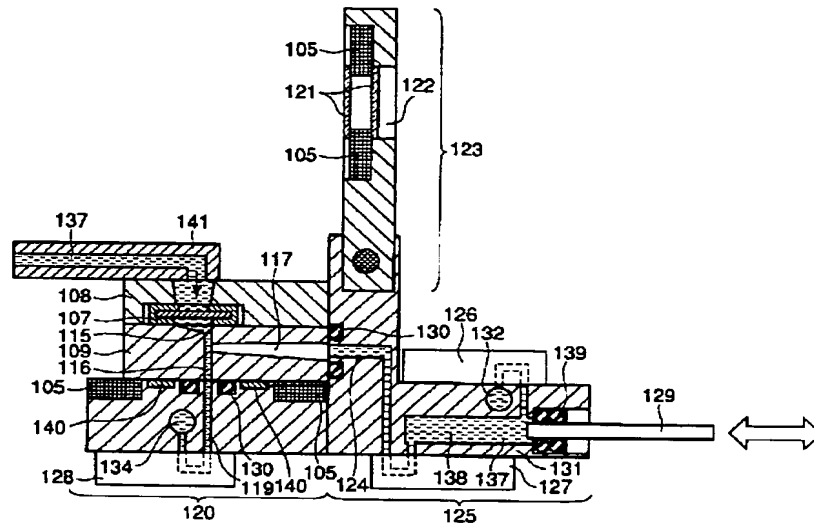
【図 7】



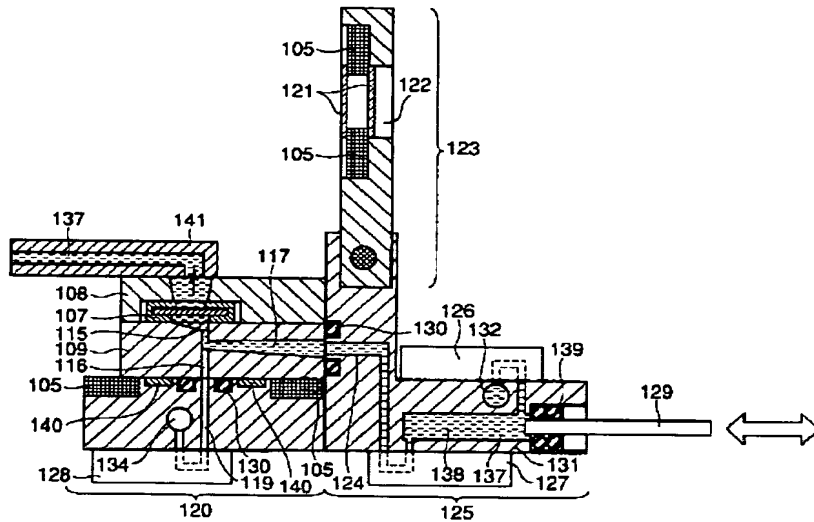
【図 11】



【図12】



【図13】



フロントページの続き

(72)発明者 石井 秀和  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内

(72)発明者 芝▲漆▼ 尊己  
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ  
ンパス光学工業株式会社内  
Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC10